

Birch, Stewart, Kolasch & Birch

703-205-8000

2185-0424P

00E, Norihisa et al.

4/14/00

4 of 4

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 4月15日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第107774号

出 願 人

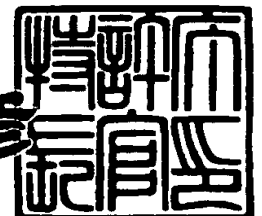
Applicant (s):

住友化学工業株式会社

2000年 3月 3日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3013684

【書類名】 特許願

【整理番号】 P150273

【提出日】 平成11年 4月15日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明の名称】 転写活性測定用細胞の作製方法

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友化学工業株式会社内

【氏名】 大江 師久

【発明者】

【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友化学工業株式会社内

【氏名】 松永 治之

【特許出願人】

【識別番号】 000002093

【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

【代表者】 香西 昭夫

【代理人】

【識別番号】 100093285

【弁理士】

【氏名又は名称】 久保山 隆

【電話番号】 06-6220-3404

【選任した代理人】

【識別番号】 100094477

【弁理士】

【氏名又は名称】 神野 直美

【電話番号】 06-6220-3404

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010238

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9701007

【プールの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 転写活性測定用細胞の作製方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

レポーター遺伝子の発現量を指標にして、リガンド応答性転写調節因子の転写調節を受ける遺伝子の転写活性を測定するための動物細胞を作製する過程において、動物細胞を、(a) リガンド応答性転写調節因子認識配列と動物細胞で機能可能な最小プロモーターとから実質的に構成される転写調節領域の下流に機能的に接続されてなるレポーター遺伝子と (b) 動物細胞で機能可能な細胞選択マーカー遺伝子とを同一分子上に含む DNA により、安定に形質転換する工程を含むことを特徴とする転写活性測定用細胞の作製方法。

【請求項 2】

(1) 動物細胞を、(a) リガンド応答性転写調節因子認識配列と、動物細胞で機能可能な最小プロモーターとから実質的に構成される転写調節領域の下流に機能的に接続されてなるレポーター遺伝子と (b) 動物細胞で機能可能な細胞選択マーカー遺伝子とを同一分子上に含む DNA により、安定に形質転換する工程を含み、前記工程 (1) と同時にまたは前後して、

(2) 該動物細胞で機能可能なプロモーターの下流に接続されてなり前記リガンド応答性転写調節因子をコードする遺伝子を含む DNA により、前記動物細胞を安定に形質転換する工程

を含む請求項 1 記載の転写活性測定用細胞の作製方法。

【請求項 3】

工程 (2) で形質転換に用いられる DNA が、工程 (1) で形質転換に用いられる DNA に含まれる細胞選択マーカー遺伝子とは表現形質の異なる細胞選択マーカー遺伝子を、同一分子上に含む DNA である請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

最小プロモーターが実質的に TATA ボックスからなるプロモーターである請求項 1 ～ 3 記載の方法。

【請求項 5】

リガンド応答性転写調節因子がアリルハイドロカーボンレセプターである請求項 1 ～ 4 記載の方法。

【請求項 6】

リガンド応答性転写調節因子が核内ホルモンレセプターである請求項 1 ～ 4 記載の方法。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 6 記載の方法で作製される転写活性測定用細胞またはその増殖物、ただし、リガンド応答性転写調節因子がエストロゲンレセプター、アンドロゲンレセプター、または甲状腺ホルモンレセプターである場合を除く。

【請求項 8】

リガンド応答性転写調節因子に対する被験化学物質のアゴニスト活性を評価する方法であって、

- (1) 請求項 1 ～ 6 記載の方法で作製される転写活性測定用細胞またはその増殖物を、被験化学物質の存在下または非存在下に培養し、
- (2) 前工程で得られた細胞におけるレポーター遺伝子の発現量を測定し、
- (3) 該発現量を比較して、被験化学物質存在下における前記発現量が、該物質非存在下における発現量よりも高い場合に、該物質が前記リガンド応答性転写調節因子に対してアゴニスト活性を有すると評価する方法。

【請求項 9】

リガンド応答性転写調節因子に対する被験化学物質のアンタゴニスト活性を評価する方法であって、

- (1) 請求項 1 ～ 6 記載の方法で作製された転写活性測定用細胞またはその増殖物を、該リガンド応答性転写調節因子のリガンドの存在下、または、前記リガンドと被験化学物質との存在下に培養し、
- (2) 前工程で得られた細胞におけるレポーター遺伝子の発現量を測定し、
- (3) 該発現量を比較して、リガンドと被験化学物質との存在下における前記発現量が、リガンド存在下における発現量よりも低い場合に、該物質が前記リガンド応答性転写調節因子に対してアンタゴニスト活性を有すると評価する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、転写活性測定用細胞の作製方法に関する。より詳しくは、リガンド応答性転写調節因子の転写調節を受ける遺伝子の転写活性を測定するために用いられる細胞の作製方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

リガンド応答性転写調節因子は、リガンドと結合すると活性化されて、染色体上の標的遺伝子の転写調節領域に存在するリガンド応答性転写調節因子認識配列に結合し、該標的遺伝子の転写を促進する機能を有する蛋白質であって、生物の恒常性の維持、生殖、発育と成長、細胞分化、エネルギー代謝、薬物代謝などに重要な役割を果たしている。このようなリガンド応答性転写調節因子による転写調節が正常に行われなくなると、該因子の標的遺伝子の転写活性に異常を来し、種々の疾患や異常の原因となることが知られている。

【発明が解決しようとする課題】

そこで、かかる疾患や異常の予防や治療に有用な薬剤を開発するために、リガンド応答性転写調節因子の転写調節能を変化させる作用を有する物質を探索する試みがなされており、該因子の転写調節能に対する化学物質の作用を調べるための効率的な方法の開発が望まれている。

【0003】

【課題を解決するための手段】

このような状況下、本発明者らは鋭意検討を行った結果、動物細胞を、特定の構成からなる転写調節領域の下流に機能的に接続されてなるレポーター遺伝子と  
(b) 動物細胞で機能可能な細胞選択マーカー遺伝子とを同一分子上に含むDNAで安定に形質転換することにより、レポーター遺伝子の発現量を指標にして、リガンド応答性転写調節因子の転写調節を受ける遺伝子の転写活性を測定するための動物細胞を、効率よく得ることができることを見出し、本発明に至った。

即ち、本発明は、

1) レポーター遺伝子の発現量を指標にして、リガンド応答性転写調節因子の転

写調節を受ける遺伝子の転写活性を測定するための動物細胞を作製する過程において、動物細胞を、(a) リガンド応答性転写調節因子認識配列と動物細胞で機能可能な最小プロモーターとから実質的に構成される転写調節領域の下流に機能的に接続されてなるレポーター遺伝子と (b) 動物細胞で機能可能な細胞選択マーカー遺伝子とを同一分子上に含むDNAにより、安定に形質転換する工程を含むことを特徴とする転写活性測定用細胞の作製方法（以下、本発明作製方法と記す。）、

2) (1) 動物細胞を、(a) リガンド応答性転写調節因子認識配列と、動物細胞で機能可能な最小プロモーターとから実質的に構成される転写調節領域の下流に機能的に接続されてなるレポーター遺伝子と (b) 動物細胞で機能可能な細胞選択マーカー遺伝子とを同一分子上に含むDNAにより、安定に形質転換する工程を含み、前記工程 (1) と同時にまたは前後して、

(2) 該動物細胞で機能可能なプロモーターの下流に接続されてなり前記リガンド応答性転写調節因子をコードする遺伝子を含むDNAにより、前記動物細胞を安定に形質転換する工程

を含む前項 1) 記載の転写活性測定用細胞の作製方法、

3) 最小プロモーターが実質的に TATA ボックスからなるプロモーターである前項 1) または 2) 記の方法、

4) リガンド応答性転写調節因子がアリルハイドロカーボンレセプターである前項 1) ～ 3) 記載の方法、

5) リガンド応答性転写調節因子が核内ホルモンレセプターである前項 1) ～ 3) 記載の方法、

6) 前項 1) ～ 5) 記載の方法で作製される転写活性測定用細胞またはその増殖物、ただし、リガンド応答性転写調節因子がエストロゲンレセプター、アンドロゲンレセプター、または甲状腺ホルモンレセプターである場合を除く、

7) リガンド応答性転写調節因子に対する被験化学物質のアゴニスト活性を評価する方法であって、

(1) 前項 1) ～ 5) 記載の方法で作製される転写活性測定用細胞またはその増殖物を、被験化学物質の存在下または非存在下に培養し、

(2) 前工程で得られた細胞におけるレポーター遺伝子の発現量を測定し、

(3) 該発現量を比較して、被験化学物質存在下における前記発現量が、該物質非存在下における発現量よりも高い場合に、該物質が前記リガンド応答性転写調節因子に対してアゴニスト活性を有すると評価する方法、

8) リガンド応答性転写調節因子に対する被験化学物質のアンタゴニスト活性を評価する方法であって、

(1) 前項 1) ~ 5) 記載の方法で作製された転写活性測定用細胞またはその増殖物を、該リガンド応答性転写調節因子のリガンドの存在下、または、前記リガンドと被験化学物質との存在下に培養し、

(2) 前工程で得られた細胞におけるレポーター遺伝子の発現量を測定し、

(3) 該発現量を比較して、リガンドと被験化学物質との存在下における前記発現量が、リガンド存在下における発現量よりも低い場合に、該物質が前記リガンド応答性転写調節因子に対してアンタゴニスト活性を有すると評価する方法を提供するものである。

#### 【0004】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明において、リガンド応答性転写調節因子とは、リガンドの結合により活性化されるレセプター型転写調節因子を意味し、具体的には、例えば、エストロゲン、アンドロゲンもしくはグルココルチコイド等のステロイドホルモン、甲状腺ホルモン、ビタミンD<sub>3</sub>やレチノイン酸等の脂溶性ビタミン、またはプロスタノイドなどのレセプターをはじめとする核内ホルモンレセプターと呼ばれる蛋白質や、エグダイソンレセプター等の昆虫ホルモンのレセプター、ダイオキシンのレセプター（アシルハイドロカーボンレセプター）などがあげられる。

#### 【0005】

本発明作製方法において、DNAが導入され形質転換される動物細胞（以下、宿主細胞と記す。）としては、例えばヒト、マウス、ラット等由来の哺乳動物細胞や昆虫動物細胞などがあげられ、操作性や再現性を考慮すると安定に継代可能な細胞が好ましい。より具体的には、例えば、ヒト由来のHeLa細胞、ヒト由来の



MCF7細胞、マウス由来のNIH3T3細胞[いずれも、American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能]などがあげられる。

【0006】

転写活性の指標とするレポーター遺伝子としては、その転写産物（レポーター蛋白質）の有する酵素活性等に基づいて発現量が測定できる遺伝子が、発現量の測定が容易である点で好ましく、例えば、ホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼなどの酵素蛋白質をコードする遺伝子があげられる。

【0007】

前記のレポーター遺伝子は、宿主細胞に導入されるDNA上で、リガンド応答性転写調節因子認識配列と最小プロモーターとから実質的に構成される転写調節領域の下流に機能的に接続される。ここで、「リガンド応答性転写調節因子認識配列」とは、リガンド応答性転写調節因子によって転写活性が調節される標的遺伝子の転写調節領域に在する特定の塩基配列であって、リガンドとリガンド応答性転写調節因子との複合体が、該配列を認識しここに結合してリガンド依存性に標的遺伝子の転写を促進する。該配列は、対応するホルモンの種類により、GRE (glucocorticoid responsive element、Nature., 318, 635-641 (1985))、PPRE (Peroxisome Proliferator responsive element、J. Steroid Biochem., Mol. Biol., 51, 157-166 (1994))、XRE (Xenobiotic response element、Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 92, 1936-1940 (1995)) などと区別して呼ばれることもある。このようなリガンド応答性転写調節因子認識配列としては、具体的には例えば、リガンド応答性転写調節因子がダイオキシン応答性のアリルハイドロカーボンレセプターである場合には、チトクロムP4501A1遺伝子[cyp1A1、J. Biol. Chem., 263, 17221-17224 (1988)、Nucleic Acids Res., 15, 4179-4191 (1987)]、グルタチオンS-トランスフェラーゼYaサブユニット遺伝子[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3826-3830 (1990)]、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ遺伝子[J. Biol. Chem., 271, 3952-3958 (1996)]などの5'上流領域の塩基配列があげられ、DREのコンセンサス配列[コア配列：5'-(T/A)GCGTG、J. Biol. Chem., 271, 3952-3958 (19

96))」を1回以上含む塩基配列もあげられる。また、リガンド応答性転写調節因子がエストロゲンレセプターである場合には、例えば、アフリカツメガエルのピテロゲニン遺伝子の5'上流領域の塩基配列 (Cell., 57, 1139-1146) 等があげられ、EREのコンセンサス配列 [5'-AGGTCA<sub>nnn</sub>TGACCTT-3'] を1回以上含む塩基配列をあげることもできる。かかる塩基配列を有するDNAは、化学合成するか、PCR法などにより増幅しクローニングすること等により調製することができる。尚、十分な転写調節能を得るには、前記のようなコンセンサス配列は通常2~5程度タンドムに連結されていることが好ましい。

また、「最小プロモーター」とは、RNAポリメラーゼIIによる転写開始部位を決定し最低限の転写水準維持に関与するDNA領域であって、コアプロモーターともいわれ、通常、遺伝子の転写開始部位付近の比較的狭い部分にみられる領域である。このような領域の塩基配列としては、例えば、TATAボックスおよび転写開始点近傍の塩基配列があげられ、具体的には例えば、マウスのメタロチオネインI遺伝子の5'上流領域の-33番目 (転写開始点を+1番目とする。以下、同様。) の塩基から+15番目の塩基までの塩基配列 (Nature., 292, 267-269 (1981)) や、チキンオボアルブミン遺伝子の5'上流領域の-40番目の塩基から+10番目の塩基までの塩基配列 (Genbank accession No.V00835) 等があげられる。本発明作製方法において用いられる「最少プロモーター」の転写活性としては、例えば、単純ヘルペスウイルス (HSV) 由来のチミジンキナーゼ (tk) 遺伝子の5'上流領域の-130番目の塩基から+53番目の塩基までの塩基配列 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 78, 1441-1445 (1981)) からなるDNA領域の転写活性よりも弱い活性であると、転写活性を測定する際の構成的なバックグラウンド転写活性が低くなりリガンド応答性の転写活性の検出が感度よく行える点から好ましい。上記のような塩基配列からなるDNAは、例えば、その塩基配列に基づいて化学合成することなどにより調製することができる。

「リガンド応答性転写調節因子認識配列と最小プロモーターとから実質的に構成される転写調節領域」とは、転写調節に関わる主たる機能性エレメントとして、目的とするリガンド応答性転写調節因子認識配列と最小プロモーターとのみを含む転写制御領域を意味し、例えば他の転写調節因子の認識配列等の転写調節に

関わる他の機能性エレメントを含まないか、または、かかる機能性エレメントを含んでいても、それは前記のリガンド応答性転写調節因子認識配列と最小プロモーターとによる転写調節能を本質的に変化させることのない配列であることを意味する。

また、「転写調節領域の下流に機能的に接続されてなるレポーター遺伝子」とは、導入される宿主細胞において該転写調節領域の制御下に発現するように、該転写調節領域と接続された状態にあるレポーター遺伝子を意味する。

#### 【0008】

本発明作製方法において、宿主細胞の形質転換に用いられるDNAには、上記のレポーター遺伝子の他に、宿主細胞（動物細胞）で機能可能な細胞選択マーカー遺伝子が含まれる。「細胞選択マーカー遺伝子」とは、該遺伝子を含むDNAで形質転換された細胞を非形質転換細胞と見分ける際に目印となり得る表現形質をコードする遺伝子である。「動物細胞で機能可能な」とは、動物細胞で前記形質を発現することができることを意味し、例えば、動物細胞で転写開始能を有するプロモーターの制御下において動物細胞で発現可能な状態にある遺伝子であって、動物細胞で有効な細胞選択用の表現形質をコードする遺伝子があげられる。動物細胞で有効な細胞選択マーカー遺伝子としては、例えば、動物細胞の増殖を抑制または阻害する薬剤に対する耐性を細胞に付与することの可能な遺伝子をあげることができ、具体的には例えば、ネオマイシン耐性付与遺伝子（アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子）、ハイグロマイシン耐性付与遺伝子（ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子）、ブラストサイジンS耐性付与遺伝子（ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子）などが挙げられ、形質転換細胞の選抜がより短期間で行える点でブラストサイジンS耐性付与遺伝子を好ましくあげることができる。ブラストサイジンS耐性付与遺伝子は、例えば、市販のプラスミドpUCSV-BSD（フナコシ社販売）などから得ることができ、ネオマイシン耐性付与遺伝子は、例えば、市販のプラスミドpRC/RSV（Invitrogen社製）などから得ることができる。

#### 【0009】

「(a) リガンド応答性転写調節因子認識配列と最小プロモーターとから実質

的に構成される転写調節領域の下流に機能的に接続されてなるレポーター遺伝子と（b）該動物細胞で機能可能な細胞選択マーカー遺伝子とを同一分子上に含むDNA」は、例えばこれらの遺伝子を同一ベクター上に組込むことによって調製することができる。ベクターとしては、取扱い易く、ベクター分子内または分子間の遺伝子組換えや安定形質転換細胞における染色体からの脱落等が起こる頻度が低くなると期待される点から、コンパクトな大きさであることが望ましく、例えば、およそ2 kb～10 kb程度のプラスミドがあげられる。また、該ベクターに遺伝子を組込むにあたって大腸菌を宿主として使用すると効率よく操作を行うことができる点から、大腸菌ベクターとしての機能、すなわち大腸菌内で機能可能な複製起点、薬剤耐性遺伝子、遺伝子挿入用制限酵素認識部位等を有していることが好ましい。より具体的には例えば、リガンド応答性転写調節因子がアリルハイドロカーボンレセプターである場合には、例えば、ホタルルシフェラーゼ遺伝子（レポーター遺伝子）を保有するプラスミドの該遺伝子の上流に、CYP1A1遺伝子の5'上流領域に由来しダイオキシン応答配列を含む塩基配列からなるDNAとマウスメタロチオネインI遺伝子由来の最小プロモーターとを組込み、さらに、該プラスミドに、例えばSV40初期プロモーターに接続されてなるプラストサイジンS耐性付与遺伝子を組込むことにより、上記の構成のDNAを調製することができる。

#### 【0010】

上述のようなレポーター遺伝子と細胞選択マーカー遺伝子とを含むDNAを、動物細胞へ導入する。例えばアリルハイドロカーボンレセプターの転写調節を受ける遺伝子の転写活性を測定することのできる細胞を作製するためには、アリルハイドロカーボンレセプターを産生するMCF7細胞などを宿主細胞に用いることができる。

レポーター遺伝子と細胞選択マーカー遺伝子とを含むDNAを宿主細胞に導入するには、例えば、まず、MCF7細胞などの宿主細胞をシャーレに播き（ $10^5 \sim 10^7$ 細胞／直径6～10cmシャーレ）、5～10%程度の血清を含有する $\alpha$ MEM培地等を用いて、5%  $\text{CO}_2$ および飽和湿度条件下に37℃で数時間～一晩程度培養する。このようにして培養した細胞へ、上記DNAを導入する。DNA導入法としては、エレクト

ロポレーション法、磷酸カルシウム法、リポフェクション法等の一般的な方法があげられる。具体的には例えば、市販のリポフェクトアミン（GIBCO製）を用いる場合には、添付のマニュアルに従って操作を行なうことができる。細胞量に対するリポフェクトアミンの量、導入されるDNAの量などについて予備検討を行い最適条件を求めておくといよい。宿主細胞に導入されるDNAの純度としては、例えば、CsCl密度勾配遠心法で精製したプラスミドDNAまたはそれとほぼ同等の純度が望ましい。宿主細胞に導入されるDNAの形状としては、上記のようなレポーター遺伝子と細胞選択マーカー遺伝子とが組込まれたプラスミドのDNAが環状のまま宿主細胞へ導入されてもよいが、一般的には、各遺伝子の発現に影響を与えない領域に存在する制限酵素部位で切断されることにより直鎖状とされたDNAが、宿主細胞に導入されるとよい。

導入されたDNAによって安定に形質転換された細胞を取得するには、例えば、まず、前記のようにしてDNAが導入された細胞を、通常の細胞培養液（培地）中で一日程度培養する。次に、細胞を常法（トリプシン処理等）に従って剥がして播き直した後、宿主細胞へ導入された細胞選択マーカー遺伝子に対応する選択条件下に培養する。即ち、細胞選択マーカー遺伝子が薬剤耐性付与遺伝子である場合は、形質転換細胞に耐性が付与される薬剤を培地に加え、形質転換細胞に由来するコロニーが適当な大きさになるまで該薬剤存在下で培養を続ける。この間必要に応じて、薬剤が添加された新しい培地への培地交換を1～3回/週の割合で行うといよい。

このようにして得られたコロニーを複数に分割して植え直し、細胞を増殖させた後、その一部に、目的とするリガンド応答性転写調節因子のリガンドの溶媒溶液を添加して24時間程度培養した後、レポーター遺伝子の発現量を測定する。また、対照として、溶媒のみを添加した系の発現量を測定する。レポーター遺伝子の発現量の測定法は、用いる個々のレポーター遺伝子の種類によるが、レポーター遺伝子産物が培地に分泌される場合を除き、一般的には細胞溶解剤処理や超音波処理等で該細胞の細胞膜を破壊して細胞抽出液を調製し、該抽出液に含まれるレポーター遺伝子産物を定量する。例えば、レポーター遺伝子産物が酵素蛋白質である場合は、前記抽出液中の酵素蛋白質を該酵素に特異的な基質と反応させ

、生ずる発光量、蛍光量、吸光度変化などを測定することによりレポーター遺伝子産物による酵素活性を定量し、レポーター遺伝子産物量、ひいては、レポーター遺伝子の発現量の指標とする。このようにして、細胞をリガンドと接触させた系のレポーター遺伝子の発現量が、溶媒のみを添加した系におけるレポーター遺伝子の発現量に対して少なくとも2倍以上、好ましくは5倍以上高い値を示した細胞を選択する。なお、このようにして得られた細胞が単一の形質転換細胞で構成されていない場合には、該細胞を限界希釈培養し、単一の細胞からなるコロニーを選択しても良い。本発明作製方法において、「(a) リガンド応答性転写調節因子認識配列と動物細胞で機能可能な最小プロモーターとから実質的に構成される転写調節領域の下流に機能的に接続されてなるレポーター遺伝子と (b) 動物細胞で機能可能な細胞選択マーカー遺伝子とを同一分子上に含むDNA」が宿主細胞に導入され、細胞選択マーカー遺伝子の形質を指標に選抜された安定形質転換細胞には、レポーター遺伝子も高い頻度で安定に導入されている。

#### 【0011】

目的とするリガンド応答性転写調節因子を産生していない動物細胞を宿主細胞として使用する場合には、該細胞に、目的とするリガンド応答性転写調節因子をコードする遺伝子を導入して発現させ該転写因子の産生能を付与する。かかるリガンド応答性転写調節因子をコードする遺伝子は、天然に存在する遺伝子であってもよいし、人為的に改変された遺伝子であってもよく、例えば異種の転写因子の機能ドメインが連結されてなる蛋白質をコードする遺伝子であってもよい。天然に存在するリガンド応答性転写調節因子の遺伝子は、該転写因子をコードする翻訳領域を増幅するためのオリゴヌクレオチドを、既知の塩基配列に基づいて設計して作製し、該オリゴヌクレオチドをプライマーに用いたPCRを行うことなどにより調製することができる。このとき、Long-PCR法用に調製された耐熱性ポリメラーゼ、例えばLA-Taq（宝酒造社製）等をPCRに用いるとよい。PCRに使用される鋳型DNAとしては、例えば、各種ヒト細胞由来の市販のmRNAに対してオリゴdTをプライマーにして逆転写酵素を反応させることによりDNAを合成しこれを用いることができる。

リガンド応答性転写調節因子の遺伝子を宿主細胞で発現させるには、該遺伝子

を、宿主細胞において発現するようにプロモーターと結合された形でベクターに挿入し、該ベクターのDNAを宿主細胞に導入するとよい。該遺伝子は、その翻訳開始コドンATGの上流に、Kozakのコンセンサス配列 (Nucleic Acids Res., 12, 857-872 (1984)) が連結されていてもよい。プロモーターとしては、宿主細胞で機能可能な、即ち転写開始能を有するプロモーターであって、例えば、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、シミアンウイルス (SV40) の初期もしくは後期プロモーター等があげられ、ベクターとしては大腸菌内で機能可能な複製起点および薬剤耐性遺伝子を有するプラスミド等があげられる。具体的には、上記のようなプロモーターを有しその下流に遺伝子挿入部位を有する市販の発現用ベクターを利用することができる。

かかるリガンド応答性転写調節因子の遺伝子を含むDNAを、レポーター遺伝子と細胞選択マーカー遺伝子とを含む上述のDNAと同様に宿主細胞へ導入し、安定形質転換株を取得する。リガンド応答性転写調節因子の遺伝子を含むDNAと、レポーター遺伝子と細胞選択マーカー遺伝子とを含むDNAは、宿主細胞へ同時に導入されてもよいし、別々に順次導入されてもよい。リガンド応答性転写調節因子の遺伝子を含む上記のDNAには、宿主細胞で機能可能な細胞選択マーカー遺伝子であって、レポーター遺伝子の導入用に用いられるDNAに含まれる細胞選択マーカー遺伝子とは異なる形質をコードする遺伝子が同一分子上にさらに含まれていることが、形質転換細胞の選択がより容易になる点で望ましい。すなわち、このような細胞選択マーカー遺伝子を含むDNAを用いて、リガンド応答性転写調節因子の遺伝子とレポーター遺伝子とを宿主細胞に導入すると、それぞれのDNAに含まれる二種の異なる細胞選択マーカー遺伝子の形質を利用して細胞を選択することにより、リガンド応答性転写調節因子の遺伝子とレポーター遺伝子とが2つとも導入された安定形質転換細胞をより容易に得ることができる。具体的には例えば、レポーター遺伝子と同一のDNA分子に含まれる細胞選択マーカー遺伝子がブラストサイジンS耐性付与遺伝子である場合には、リガンド応答性転写調節因子の遺伝子を宿主細胞へ導入するために用いられるDNAに含まれる細胞選択マーカー遺伝子として、例えばネオマイシン耐性付与遺伝子を用いることができる。

また、目的とするリガンド応答性転写調節因子の産生する動物細胞を宿主細胞として用いる場合においても、前記と同様にして、該転写調節因子をコードする遺伝子を細胞に導入して発現させ、該転写調節因子の産生能を増強してもよい。また、例えば核内ホルモンレセプターのコアクチベーターなど、該レセプターの転写調節を受ける遺伝子の転写活性を増強する機能を有する蛋白質をコードする遺伝子を宿主細胞に導入して発現させてもよく、このようにして内在するリガンド応答性転写調節因子の転写調節能を増強することもできる。

#### 【0012】

本発明作製方法で作製された転写活性測定用細胞（以下、本発明細胞と記す。）または該細胞を培養して得られる増殖物は、例えば、リガンド応答性転写調節因子に対して、アゴニスト活性を示す化学物質や、アンタゴニスト活性を示す化学物質の同定に利用することができる。

具体的には、例えば、まず、本発明細胞を細胞培養容器に播種し培養する。96穴プレートを使用する場合は、通常、1穴あたり $10^3$ から $2 \times 10^4$ 個程度の細胞を播種し、数時間～一晩程度培養するとよい。また、血清が添加された培地を培養に用いる場合には、培地に加える血清を例えば活性炭等で処理して血清中に微量含まれるリガンドをあらかじめ除いておいてもよい。次いで、かかる細胞培養液に被験化学物質を添加する。被験化学物質のアゴニスト活性を測定する場合には、被験化学物質を溶媒に溶解させた溶液、または、溶媒のみを、培養液における溶媒の最終体積濃度が通常0.5%～2%以下になるようにして前記の細胞培養液に添加する。また、被験化学物質のアンタゴニスト活性を測定する場合には、試験対象のリガンド応答性転写調節因子のリガンドを溶媒に溶解させた溶液が、培養液における該リガンドの濃度が通常 $EC_{50}$ 程度となるように前記培養液に添加された系、および、前記の系にさらに被験化学物質が添加された系を調製する。上記のようにして培養液に添加される溶媒には、例えば、蒸留水、ジメチルスルフォキシド（DMSO）、エタノール等が用いられる。また、被験化学物質を水溶液として添加する場合には、該水溶液をポアサイズ $20 \mu m$ 以下のフィルターなどでろ過滅菌した後に培養系に添加するとよい。

前記の細胞を、例えば、数時間以上72時間程度まで培養した後、上述のよう



にレポーター遺伝子の発現量を測定する。例えば、レポーター遺伝子がホタルルシフェラーゼ遺伝子である場合には、まず培養上清を除去した後、器壁に接着した細胞をPBS(-)等で洗い、該細胞に細胞溶解剤などを添加して細胞を破壊し細胞抽出物を調製する。この細胞抽出物をレポーター遺伝子産物であるルシフェラーゼの試料として、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンと反応させ、生ずる発光量を定量する。被験化学物質のアゴニスト活性を測定する試験系において、溶媒のみが添加された系の細胞よりも、被験物質が添加された系の細胞の方が、細胞あたりのルシフェラーゼ活性が高い、すなわち、レポーター遺伝子産物量が多い場合は、その被験物質は試験対象のリガンド応答性転写調節因子に対してアゴニスト活性を示すと判断される。また、被験化学物質のアンタゴニスト活性を測定する試験系において、試験対象のリガンド応答性転写調節因子のリガンドのみが添加された系の細胞のルシフェラーゼ活性に比較して、該リガンドと被験化学物質とが添加された系の細胞のルシフェラーゼ活性が低い場合には、その被験物質は該リガンド応答性転写調節因子に対してアンタゴニスト活性を持つと判断される。

### 【0013】

前述のような試験系において、被験化学物質が細胞に対して非特異的な毒性を示す場合に、リガンド応答性転写調節因子の転写調節能にかかわらずレポーター遺伝子の転写活性が低下することがある。また、被験化学物質が最小プロモーターに対して非特異的に転写促進作用または転写抑制作用を示す場合に、リガンド応答性転写調節因子の転写調節能にかかわらずレポーター遺伝子の転写活性が上昇または低下することがある。そこで、例えば、遺伝子を構成的に転写する機能を有するプロモーターに機能的に結合されてなるレポーター遺伝子で安定に形質転換されてなる細胞を調製し、本発明細胞の比較対照として用いてもよい。具体的には、例えば、RSVプロモーターやTKプロモーターなどに機能的に結合されてなるレポーター遺伝子を含むDNAを調製し、該DNAにより宿主細胞を安定に形質転換する。得られたコロニーの中から、安定してかつ構成的にレポーター遺伝子を発現する細胞（以下、対照細胞と記す。）を選択する。この細胞に前述と同様に被験化学物質を接触させて、レポーター遺伝子の発現量を定量する。被験

化学物質の接触により該細胞のレポーター遺伝子の発現量が低下または上昇した場合には、該物質は細胞またはプロモーターに対して非特異的な作用を示すことが示唆される。そこで、このような結果に基づいて本発明細胞を用いた試験の結果を適宜補正し、前述のようなりガンド応答性転写調節因子に対する化学物質の作用を評価してもよい。

【0014】

上述のようにして、本発明細胞を用いてリガンド応答性転写調節因子の転写調節を受ける遺伝子の転写活性を測定することができ、かかる測定値に基づいて該転写調節因子の転写調節能に対する化学物質の作用を評価することができ、該転写調節因子に対するアゴニストやアンタゴニストを同定することができる。かかる評価、同定方法は、リガンド応答性転写調節因子をターゲットとする医薬品の有効成分の探索や、ダイオキシン様物質や内分泌攪乱化学物質等の検出などに利用できる。

本発明細胞は凍結保存が可能であり、必要に応じて起眠して使用することができる。本発明細胞を試験に用いることにより、レポーター遺伝子が一過性に導入された細胞を用いる場合と比較して、試験毎の遺伝子導入や細胞選抜等の煩雑な操作を省くことができ、また、一定の性能の細胞を試験に用いることができることから、再現性良く測定することが可能となる。よって、本発明細胞は、例えばハイスループットスクリーニング等の自動化された大規模スクリーニング法により上述のような化学物質の探索や検出等を行う際にも有用である。

【0015】

【実施例】

以下に、実施例および試験例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0016】

実施例 1 (リガンド応答性転写調節因子認識配列および最小プロモーターの転写調節を受けるレポーター遺伝子と、細胞選択マーカ－遺伝子とを含むプラスミドの作製)

(1) アリルハイドロカーボンレセプター認識配列を含むプラスミド

Isogen試薬（ニッポンジーン社製）を用いて該試薬に添付のプロトコールに記載の方法で、ヒト由来のHepG2細胞からゲノムDNAを精製した。該ゲノムDNAを鋳型として、フォワードプライマー：5'-TTGAGCTAGGCACGCAAATA-3' およびリバースプライマー：5'-GCTTTGATTGGCAGAGCACA-3' を用いてPCRを行なうことにより、ヒトCYP1A1遺伝子上流のTATAboxから750bp上流～1370bp上流の領域の塩基配列（J.Biochem.,110.232-236(1991)）を有し、アリルハイドロカーボンレセプター認識配列であるXREを含むDNAを増幅した。増幅されたDNAを回収し、その末端をBlunting kit（宝酒造社製）を用いて平滑化した（該DNAを、以下、XRE DNAと記す。）。

マウスメタロチオネインI遺伝子のTATA box近傍の塩基配列とリーダー配列（Genbank Accession No.J00605）に由来する塩基配列からなる2本のオリゴヌクレオチド；5'-GATCTCGACTATAAAGAGGGCAGGCTGTCCTCTAAGCGTCACCACGACTTCA-3'、および、5'-AGCTTGAAGTCGTGGTGACGCTTAGAGGACAGCCTGCCCTCTTTATAGTCGA-3' をアニーリングさせて2本鎖DNAとし、これにT4ポリヌクレオチドカインースを作用させてその両末端をリン酸化した（該DNAを、以下、TATA DNAと記す。）。一方、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドpGL3（プロメガ社製）を制限酵素Bgl IIおよびHind IIIで消化した後、これにBacterial alkaline phosphatase(BAP)を加えて65℃で1時間保温した。次いで、該保温液を低融点アガロース（AgaroseL；ニッポンジーン社製）を用いた電気泳動に供し、pGL3由来のルシフェラーゼ遺伝子を含むBgl II-Hind III断片の長さに相当する泳動度を示すDNAを回収した。該DNA約100ngと、前記のTATA DNA 1μgとを混合し、T4リガーゼで結合させることによりプラスミドpGL3-TATAを作製した。

次に、pGL3-TATAを制限酵素Sma Iで消化した後、BAPを加えて65℃で1時間保温した。該保温液を低融点アガロースゲル電気泳動に供し、バンド部分のゲルからDNAを回収した。該DNA約100ngと、上記 XRE DNA約1μgとを混合してT4リガーゼを反応させた後、該反応液をDH5αコンピテントセル（TOYOBO製）へ導入した。アンピシリン耐性を示した大腸菌のコロニー数個からそれぞれの保有するプラスミドのDNAを調製し、これらを制限酵素Kpn IおよびXho Iで消化して該消化液をアガロースゲル電気泳動で分析した。XRE DN

Aに相当する約600bpのDNAがpGL3-TATAのSma I部位に1コピー導入された構造を有するプラスミドを選択し、これをプラスミドpGL3-TATA-1A1と名づけた。

次いで、プラスミドpUCSV-BSD（フナコシ社から購入）をBamHIで消化し、ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードするDNAを調製した。該DNAと、前記プラスミドpGL3-TATA-1A1をBamHIで消化しBAP処理して得られたDNAとを混合して、T4リガーゼを反応させた後、該反応液を大腸菌 DH5 $\alpha$ コンピテントセル（TOYOBO製）に導入した。得られたアンピシリン耐性の大腸菌クローンからプラスミドDNAを調製し、それぞれを制限酵素Bam HIで消化して該消化液をアガロースゲル電気泳動で分析した。ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットがプラスミドpGL3-TATA-1A1のBam HI切断部位に挿入された構造を有するプラスミドを選択し、プラスミドpGL3-TATA-1A1-BSDと名づけた。

【0017】

## （2）エストロゲンレセプター認識配列を含むプラスミド

エストロゲンレセプター認識配列を含むアフリカツメガエル由来ピテロゲニン遺伝子上流の塩基配列（5'-TCGACAAAGTCAGGTCACAGTGACCTGATCAAG-3'）からなるオリゴヌクレオチドおよび該塩基配列と相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをDNA合成機にて合成し、これらをアニーリングさせて2本鎖DNA（該DNAを、以下、ERE DNAと記す。）とした後、T4リガーゼを作用させて該2本鎖DNAをタンデムに結合させ、これにT4ポリヌクレオチドカイネースを作用させてその両末端をリン酸化した。

次に、上記（1）に記載されたようにして作製されたプラスミドpGL3-TATAを制限酵素Sma Iで消化した後、BAPを加えて65℃で1時間保温した。該保温液を低融点アガロースゲル電気泳動に供し、バンド部分のゲルからDNAを回収した。該DNA約100ngと、前記のERE DNAがタンデムに結合され末端をリン酸化されてなるDNA約1 $\mu$ gとを混合してT4リガーゼを反応させた後、該反応液を大腸菌 DH5 $\alpha$ コンピテントセル（TOYOBO製）へ導入した。アンピシリン耐性を示した大腸菌のコロニー数個からそれぞれの保有するプラスミドのD

NAを調製し、これらを制限酵素Kpn IおよびXho Iで消化して該消化液をアガロースゲル電気泳動で分析した。pGL3-TATAのSma I部位にERE DNAがタンデムに5コピー導入された構造を有するプラスミドを選択し、これをプラスミドpGL3-TATA-EREx5と名づけた。

次いで、プラスミドpUCSV-BSD（フナコシ社から購入）をBamHIで消化し、ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードするDNAを調製した。該DNAと、前記プラスミドpGL3-TATA-EREx5をBamHIで消化しBAP処理して得られたDNAとを混合して、T4リガーゼを反応させた後、該反応液を大腸菌DH5 $\alpha$ コンピテントセルに導入した。得られたアンピシリン耐性の大腸菌クローンからプラスミドDNAを調製し、それぞれを制限酵素Bam HIで消化して該消化液をアガロースゲル電気泳動で分析した。ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットがプラスミドpGL3-TATA-EREx5のBam HI切断部位に挿入された構造を有するプラスミドを選択し、プラスミドpGL3-TATA-EREx5-BSDと名づけた。

#### 【0018】

参考例1（リガンド応答性転写調節因子認識配列およびHSV-tkプロモーターの転写調節を受けるレポーター遺伝子と、細胞選択マーカー遺伝子とを含むプラスミドの作製）

まず、pTK $\beta$ （クロンテック社製）プラスミドのHSV-tkプロモーター部分の配列に基き、フォワードプライマー：5'-CGGCAGATCTTCTTTAGTTCTATGATGACAC-3'、および、リバースプライマー：5'-CGGAAGCTTGATCTGCGGCACGCTGTTGA-3'を設計し、DNA合成機にて合成した。この2種のプライマーを用いて、プラスミドpTK $\beta$  1 ngを鋳型にしてPCRを行い、HSV-tkプロモーター領域の-131番目（転写開始点を+1番目とする。）の塩基から+54番目の塩基までの塩基配列を含む185bpのDNAを得た。該DNAの5'末端および3'末端近傍にはそれぞれ、上記PCRプライマーにより導入されたBgl II認識部位またはHind III認識部位が含まれる。次に、該DNAをBgl II及びHind IIIで消化した後、低融点アガロース[NusieveGTG（FMC社製）]を用いたゲル電気泳動に供し、ゲルからDNAを回収した。一方、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドpGL3（プロメガ社製）を制限酵素Bgl IIおよびHind IIIで消化した後、これにBacterial alkali

ne phosphatase(BAP)を加えて65℃で1時間保温した。次いで、該保温液を低融点アガロース (Agarose L; ニッポンジーン社製) を用いた電気泳動に供し、pGL3由来のルシフェラーゼ遺伝子を含むBgl II-Hind III断片の長さに相当する泳動度を示すDNAを回収した。このベクターDNA約100ngに対して、上記のように調製されたHSV-tkプロモーター領域を含む約200bpのDNA約1μgを混合し、これにT4 Ligaseを反応させた後、大腸菌 DH5αコンピテントセル (TOYOBO製) に導入した。得られたアンピシリン耐性クローンからプラスミドを調製し、pGL3のBgl II-Hind III部位間に1コピーのHSV-tkプロモーターが導入されたプラスミドを選択し、これをpGL3-tkと名づけた。

実施例1(2)の記載に従って調製されたERE DNAに、T4リガーゼを作用させて該2本鎖DNAをタンデムに結合させ、これにT4ポリヌクレオチドカイネースを作用させてその両末端をリン酸化した。

上述のpGL3-tkを制限酵素Sma Iで消化した後、BAPを加えて65℃で1時間保温した。該保温液を低融点アガロースゲル電気泳動に供し、バンド部分のゲルからDNAを回収した。該DNA約100ngと、上記のタンデムに結合させ末端をリン酸化したERE DNA約1μgとを混合してT4リガーゼを反応させた後、該反応液を大腸菌 DH5αコンピテントセル (TOYOBO製) へ導入した。アンピシリン耐性を示した大腸菌のコロニー数個からそれぞれの保有するプラスミドのDNAを精製し、これらを制限酵素Kpn IおよびXho Iで消化して該消化液をアガロースゲル電気泳動で分析した。pGL3-tkのSma I部位にERE DNAがタンデムに5コピー導入された構造を有するプラスミドを選択し、これをプラスミドpGL3-tk-EREx5と名づけた。

次いで、プラスミドpUCSV-BSD (フナコシ社から購入) をBamHIで消化し、ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードするDNAを調製した。該DNAと、前記プラスミドpGL3-tk-EREx5をBamHIで消化しBAP処理して得られたDNAとを混合して、T4リガーゼを反応させた後、該反応液を大腸菌DH5αコンピテントセルに導入した。得られたアンピシリン耐性の大腸菌クローンからプラスミドDNAを調製し、それぞれを制限酵素Bam HIで消化して該消化液をアガロースゲル電気泳動で分析した。ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発

現カセットがプラスミドpGL3-tk-EREx5のBam HI切断部位に挿入された構造を有するプラスミドを選択し、プラスミドpGL3-tk-EREx5-BSDと名づけた。

【0019】

実施例2 (リガンド応答性転写調節因子発現プラスミドの作製)

(1) エストロゲンレセプター $\alpha$ 発現プラスミド

ヒトエストロゲンレセプター $\alpha$ をコードするcDNAを取得するために、Genbank Accession NO.M12674に公開されているエストロゲンレセプター $\alpha$ 遺伝子の塩基配列に基づき、フォワードプライマー：5'-CCTGCGGGGACACGGTCTGCACCCTGCCCCGGG CC-3'、および、リバースプライマー：5'-CAGGGAGCTCTCAGACTGTGGCAGGGAAACCCTC T-3'を設計し、DNA合成機（アプライドバイオシステムズ社製モデル394）を用いて合成した。

次に、ヒト肝 cDNA 10ng（クロンテック社製クイッククローンcDNA # 7113-1）を鋳型にし、前記のプライマーをそれぞれ1.0 pmol添加し、LA-Taqポリメラーゼ（宝酒造社製）および該酵素に添付されたバッファーを用いて、反応液量を50  $\mu$ lとしてPCR反応を行った。該反応は、PCRsysteM 9700（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、95℃1分間次いで68℃3分間の保温を1サイクルとしてこれを35サイクル行った。次いで、該反応液全量を、低融点アガロース（アガロースL：ニッポンジーン）を用いたアガロースゲル電気泳動に供した。既知配列から予想される大きさのバンドが増幅されていることを確認した後、そのバンドからDNAを回収し、該DNAとダイターミネーターシーケンスキットFS（アプライドバイオシステムズ社製）とを用いてダイレクトシーケンス用のサンプルを調製した。これを、オートシーケンサー（アプライドバイオシステムズ社製、モデル377）を用いた塩基配列解析に供し塩基配列を確認した。

上記のようにして取得されたDNA約100 ngを鋳型にして、フォワードプライマー：5'-CCCAGCCACCATGACCATGACCCTCCACACCAAAGCATCT-3'、および、リバースプライマー：5'-CAGGGAGCTCTCAGACTGTGGCAGGGAAACCCTCT-3'を用いたPCRを行い、エストロゲンレセプター $\alpha$ 遺伝子の翻訳開始コドンATGの直前にコザックのコンセンサス配列が付加されたDNAを調製した。すなわち、鋳型となるエストロゲン

レセプター  $\alpha$  cDNA 0.1  $\mu$ g、LA-Taq ポリメラーゼ（宝酒造社製）、該酵素に添付された反応バッファー、および上記プライマー各 10 pmol ずつを混合し、反応液量を 50  $\mu$ l として、95℃ 1 分間、次いで 68℃ にて 3 分間の保温を 1 サイクルとしてこれを 20 サイクル行った。このようにして得られた増幅物を低融点アガロースゲル電気泳動法により分離回収した。次にその約 1  $\mu$ g を、DNA blunting キット（宝酒造社製）で処理してその末端を平滑化し、これに次に T4 ポリヌクレオチドカイネースを反応させてその末端をリン酸化した。該 DNA をフェノール処理した後、エタノール沈殿法により精製し、その全量を下記の発現プラスミド作製のインサート DNA として用いた。

RSV プロモーターおよびネオマイシン耐性付与遺伝子を含む pRC/RSV（Invitrogen 社製）を制限酵素 Hind III で消化した後、BAP を加えて 65℃ で 1 時間保温した。次にフェノール処理・エタノール沈殿によりこれを精製した後、Blunting キット（宝酒造社製）で処理して末端を平滑化し、低融点アガロース（ニッポンジーン社製；アガロース L）を用いたアガロースゲル電気泳動に供し、バンド部分のゲルから DNA を回収した。回収されたベクター DNA 約 100 ng と、上記のインサート DNA 全量を混合し、T4 リガーゼを添加して反応させた。該反応液を大腸菌 DH5  $\alpha$  コンピテントセルへ導入し、アンピシリン耐性を示したコロニーからプラスミド DNA を調製し、その塩基配列を ABI モデル 377 型オートシーケンサーを用いてダイターミネーター法で決定した。得られた塩基配列を、前述のダイレクトシーケンスで得られた塩基配列と比較して、翻訳領域の塩基配列が完全に一致していることが確認されたプラスミドを選択し、pRC/RSV-hER  $\alpha$  コザックと名づけた。

#### 【0020】

実施例 3（エストロゲンレセプターの転写調節を受ける遺伝子の転写活性を測定するための本発明細胞の作製）

NIH 3T3 細胞に、実施例 1（2）で作製されたプラスミド pGL3-TATA-EREx5-BSD または参考例 1 で作製されたプラスミド pGL3-tk-EREx5-BSD の DNA、および、実施例 2 で作製されたエストロゲンレセプターの発現プラスミド pRC/RSV-hER  $\alpha$  コザックの DNA を、それぞれ直鎖化して導入し、エストロゲンレセプター



の転写調節を受ける遺伝子の転写活性測定に用いることのできる細胞を作製した。

まず、プラスミドpGL3-TATA-EREx5-BSDのDNA、プラスミドpGL3-tk-EREx5-BSDのDNA、および、プラスミドpRC/RSV-hER $\alpha$ コザックのDNAをそれぞれSal Iで消化した。

NIH3T3細胞は、10%FBSを含むDMEM培地（日水製薬社製）を用いて37℃にて5%CO<sub>2</sub>存在下に、直径約10cmのシャーレ（ファルコン社製）を用いて培養した。約 $5 \times 10^5$ の細胞を培養し、翌日、該細胞にリポフェクトアミン（GIBCO社製）を用いたリポフェクション法で、上記の直鎖化されたプラスミドのDNAを次の組み合わせで導入した；①pGL3-TATA-EREx5-BSDおよびpRC/RSV-hER $\alpha$ コザック、②pGL3-tk-EREx5-BSDおよびpRC/RSV-hER $\alpha$ コザック。リポフェクション法の条件はリポフェクトアミンに添付されたマニュアルの記載に従って、処理時間5時間、直鎖化されたプラスミドDNAの総量7 $\mu$ g（各々3.5 $\mu$ g）/シャーレ、リポフェクトアミン量は42 $\mu$ l/シャーレとした。リポフェクション処理後、培地を10%FBSを含むDMEM培地に交換して約36時間培養した。次いで、該細胞をトリプシン処理によりシャーレから剥がして回収し、終濃度800 $\mu$ g/mlのG418および終濃度16 $\mu$ g/mlのブラストサイジンSが添加された培地の入った培養容器に移し、培地を3日から4日ごとに新しい培地（前記の選択薬剤入り）に交換しながら約1ヶ月間培養した。出現した直径1mmから数mmの細胞コロニーを、あらかじめ培地を分注しておいた96穴ビュープレート（ベルトールド社製）にコロニーごと移し、さらに培養した。細胞がウェルの底面の半分以上を占める程度までに増殖したときに（移植から約5日後）、トリプシン処理により細胞を剥がして回収し、三分して3枚の新しい96穴ビュープレートに播種した。一枚はそのまま継代と培養を続け、マスタープレートとした。残り二枚のうち的一方にはDMSOに溶解させた17 $\beta$ エストラジオールを終濃度が10nMとなるように加え、もう一方には前記の17 $\beta$ エストラジオール溶解液と同容積のDMSOを加え、それぞれを2日間培養した。次いでこれら2枚のプレートについて、ウェルから培地を除き、器壁に接着している細胞をPBS(-)で2回洗浄した後、5倍に希釈したPGC

50 (東洋インキ社製) をウェルあたり 20  $\mu$  l ずつ加えて室温に 30 分間放置した。該プレートを、酵素基質自動インジェクター付きルミノメーター LB96 P (ベルトールド社製) にそれぞれセットし、50  $\mu$  l の基質液 PGL100 (東洋インキ社製) を自動分注して、ルシフェラーゼ活性を測定した。

①pGL3-TATA-EREx5-BSD および pRC/RSV-hER $\alpha$  コザックの DNA を導入して得られた形質転換細胞のうち、288 個のクローンについて上記試験を行った。17  $\beta$  エストラジオールを加えていない系におけるルシフェラーゼ活性値に対して、10 nM 17  $\beta$  エストラジオールを添加した系におけるルシフェラーゼ活性値が、2 倍未満のクローンが 50 個、2 倍以上 5 倍未満のクローンが 40 個、5 倍以上 10 倍未満のクローンが 56 個、10 倍以上 50 倍未満のクローンが 118 個、50 倍以上 100 倍未満のクローンが 15 個、100 倍以上のクローンが 9 個であった。

一方、②pGL3-tk-EREx5-BSD および pRC/RSV-hER $\alpha$  コザックの DNA を導入して得られた形質転換細胞のうち、192 個のクローンについて上記試験を行った。17  $\beta$  エストラジオールを加えていない系におけるルシフェラーゼ活性値に対して、10 nM 17  $\beta$  エストラジオールを添加した系におけるルシフェラーゼ活性値が、2 倍未満のクローンが 100 個、2 倍以上 5 倍未満のクローンが 64 個、5 倍以上 10 倍未満のクローンが 25 個、10 倍以上 50 倍未満のクローンが 3 個、50 倍以上 100 倍未満のクローンが 0 個、100 倍以上のクローンが 0 個であった。

#### 【0021】

実施例 4 (アリルハイドロカーボンレセプターの転写調節を受ける遺伝子の転写活性を測定するための本発明細胞の作製)

アリルハイドロカーボンレセプターを発現するヒト由来の MCF7 細胞に、実施例 1 で作製されたプラスミド pGL3-TATA-1A1-BSD の DNA を直鎖化して導入し、アリルハイドロカーボンレセプターの転写調節を受ける遺伝子の転写活性測定に用いることのできる本発明細胞を作製した。

まず、プラスミド pGL3-TATA-1A1-BSD の DNA を Sal I で消化した。

また、MCF7 細胞は、10% FBS を含む DMEM 培地 (日水製薬社製) を

用いて37℃にて5%CO<sub>2</sub>存在下に、直径約10cmのシャーレ（ファルコン社製）を用いて培養した。約 $5 \times 10^5$ の細胞を培養し、翌日、該細胞にリポフェクトアミン（GIBCO社製）を用いたリポフェクション法で、上記の直鎖化されたプラスミドpGL3-TATA-1A1-BSDのDNAを導入した。リポフェクション法の条件はリポフェクトアミンに添付されたマニュアルの記載に従って、処理時間5時間、直鎖化されたプラスミドDNA量7 $\mu$ g/シャーレ、リポフェクトアミン量は56 $\mu$ l/シャーレとした。リポフェクション処理後、培地を10%FBSを含むDMEM培地に交換して約36時間培養した。次いで、該細胞をトリプシン処理によりシャーレから剥がして回収し、終濃度16 $\mu$ g/mlの細胞選択薬剤プラストサイジンSが添加された培地の入った培養容器に移し、培地を3日から4日ごとに新しい培地（選択薬剤入り）に交換しながら1ヶ月半の間培養した。出現した直径1mmから数mmの細胞コロニーを、あらかじめ培地を分注しておいた96穴ビュープレート（ベルトールド社製）にコロニーごと移し、さらに培養した。細胞がウェルの底面の半分以上を占める程度までに増殖したときに（移植から約5日後）、トリプシン処理により細胞を剥がして回収し、三等分して3枚の新しい96穴ビュープレートに播種した。一枚はそのまま継代と培養を続け、マスタープレートとした。残り二枚のうちの一方にはDMSOに溶解させた3-メチルコランスレンを終濃度が50 $\mu$ Mとなるように加え、もう一方には前記の3-メチルコランスレン溶解液と同容積のDMSOを加え、それぞれを二日間培養した。次いでこれら2枚のプレートについて、ウェルから培地を除き、器壁に接着している細胞をPBS(-)で二回洗浄した後、5倍に希釈したPGC50（東洋インキ社製）をウェルあたり20 $\mu$ lずつ加えて室温に30分間放置した。該プレートを、酵素基質自動インジェクター付きルミノメーターLB96P（ベルトールド社製）にそれぞれセットし、50 $\mu$ lの基質液PGL100（東洋インキ社製）を自動分注して、ルシフェラーゼ活性を測定した。3-メチルコランスレンを添加した系の方が、3-メチルコランスレンを加えていない系よりも、少なくとも2倍以上高いルシフェラーゼ活性を示す細胞を選択した。

【0022】

実施例5 対照細胞作製用レポータープラスミドの作製

(1) レポーター遺伝子がTKプロモーターの転写調節下に接続されたプラスミド  
 まず、プラスミドpRL-TK (プロメガ社製) をHind IIIおよびBgl IIで消化し、  
 低融点アガロース (アガロースL; ニッポンジーン社製) を用いたゲル電気泳動  
 に供し、TKプロモーターを含む760bpのDNAを回収した。次に、プラスミドp  
 GL3をHind IIIとBgl IIとで消化し、さらにこれにBAPを加えて65℃1時間保温  
 した後、該保温液を低融点アガロースゲル電気泳動に供して、pGL3由来のルシフ  
 ェラーゼ遺伝子を含むBgl II-Hind III断片の長さに相当する泳動度を示すDN  
 Aを回収した。該DNAのうち約0.1μgを、上記のTKプロモーターを含むDN  
 A約0.2μgと混合し、これをT4 リガーゼと反応させ、大腸菌DH5αコンピテ  
 ントセル (TOYOBO製) へ導入した。得られたアンピシリン耐性クローンか  
 らプラスミドDNAを調製し、それぞれを制限酵素Hind IIIおよびBgl IIで消化し  
 、該消化液をアガロースゲル電気泳動で分析した。pGL3のHind IIIとBgl IIサイ  
 トとの間に上記のTKプロモーターを含むDNAが挿入された構造を有するプラスミ  
 ドを選択し、これをプラスミドpGL3-TKと名づけた。次にこのpGL3-TKのDNAを  
 BamH Iで消化し、さらにこれにBAPを加えて65℃で1時間保温した後、該保温  
 液を低融点アガロースゲル電気泳動に供して、単一のバンドが検出されることを  
 確認した後そのバンド部分のゲルからDNAを回収した。該DNAと、プラスミ  
 ドpUCSV-BSD (フナコシ社より購入) をBamHI消化して調製されたブラストサイジ  
 ンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードするDNAとを、T4 Ligaseで結  
 合させることにより、ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットがpG  
 L3-TKのBamHI切断部位に挿入された構造を有するプラスミドを選択し、プラスミ  
 ドpGL3-TK-BSDを得た。

【0023】

(2) レポーター遺伝子がRSVプロモーターの転写調節下に接続されたプラスミ  
 ド

まず、プラスミドpRC/RSVをBgl IIおよびHind IIIで消化し、低融点アガロー  
 ス (アガロースL; ニッポンジーン社製) を用いたゲル電気泳動に供し、RSVプロ  
 モーターを含む594bpのDNAを回収した。プラスミドpGL3をHind IIIとBg  
 l IIとで消化し、さらにこれにBAPを加えて65℃1時間で保温した後、該保温

液を低融点アガロースゲル電気泳動に供して、pGL3由来のルシフェラーゼ遺伝子を含むBgl II-Hind III断片の長さに相当する泳動度を示すDNAを回収した。該DNAのうち約0.1 $\mu$ gを、上記のRSVプロモーターを含むDNA約1 $\mu$ gと混合し、これをT4 リガーゼと反応させ、大腸菌DH5 $\alpha$ コンピテントセル（TOYOBO製）へ導入した。得られたアンピシリン耐性クローンからプラスミドDNAを調製し、それぞれを制限酵素Hind IIIおよびBgl IIで消化し、該消化液をアガロースゲル電気泳動で分析した。pGL3のHind IIIとBgl IIサイトとの間に上記のRSVプロモーターを含むDNAが挿入された構造を有するプラスミドを選択し、これをプラスミドpGL3-RSVと名づけた。次にこのプラスミドをBamHIで消化し、さらにこれにBAPを加えて65℃で1時間保温した後、該保温液を低融点アガロースゲル電気泳動に供して、単一のバンドが検出されることを確認した後そのバンド部分のゲルからDNAを回収した。該DNAと、プラスミドpUCSV-BSD（フナコシ社より購入）をBamHI消化して調製されたブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードするDNAとを、T4 Ligaseで結合させることにより、ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットがpGL3-RSVのBamHI切断部位に挿入された構造を有するプラスミドを選択し、プラスミドpGL3-RSV-BSDを得た。

## 【0024】

## 実施例6 （対照細胞の作製）

実施例5（1）で作製されたプラスミドpGL3-TKはSal Iで、実施例5（2）で作製されたプラスミドpGL3-RSVはXhoIで、それぞれ消化した。

また、HeLa細胞は、10% FBSを含むDMEM培地（日水製薬社製）で37℃にて5%CO<sub>2</sub>存在下に直径約10cmのシャーレ（ファルコン社製）を用いて培養した。約5 $\times$ 10<sup>5</sup>の細胞を培養し、翌日、該細胞にリポフェクトアミン（GIBCO社製）を用いたリポフェクション法で、上記の直鎖化されたプラスミドをpGL3-RSVまたはpGL3-TKを導入した。リポフェクション法の条件はリポフェクトアミンに添付されたマニュアルの記載に従って、処理時間5時間、直鎖化されたプラスミドDNA量7 $\mu$ g/シャーレ、リポフェクトアミン量は21 $\mu$ l/シャーレとした。リポフェクション処理後、培地を10% FBSを含むDME

M培地に交換して36時間程度培養した。次いで、該細胞をトリプシン処理によりシャーレから剥がして回収し、終濃度 $16\mu\text{g}/\text{ml}$ の細胞選択薬剤ブラストサイジンSが添加された培地の入った培養容器に移し、培地を3日から4日ごとに新しい培地（選択薬剤入り）に交換しながら1ヶ月間培養した。出現した直径1mmから数mmの細胞コロニーを、あらかじめ培地を分注しておいた96穴ビュープレート（ベルトールド社製）にコロニーごと移し、さらに培養した。細胞がウェルの底面の半分以上を占める程度までに増殖したときに（移植から約5日後）、トリプシン処理により細胞を剥がして回収し、2等分して2枚の新しい96穴ビュープレートに播種した。一枚はそのまま継代と培養を続け、マスタープレートとした。残りの1枚は、ウェルから培地を除いて器壁に接着している細胞をPBS(-)で2回洗浄した後、5倍に希釈したPGC50（東洋インキ社製）をウェルあたり $20\mu\text{l}$ ずつ加えて室温に30分間放置した。このプレートを、酵素基質自動インジェクター付きルミノメーターLB96P（ベルトールド社製）にセットし、 $50\mu\text{l}$ の基質液PGL100（東洋インキ製）を自動分注して、ルシフェラーゼ活性を測定した。測定試薬のみが添加されたウェルよりも高い発光測定値を与えるようなルシフェラーゼ活性を示すクローンを対照細胞として選択した。

## 【0025】

## 試験例1（本発明細胞を用いたレポーターアッセイ）

実施例3または4に記載のようにして作製された本発明細胞を、フェノールレッドフリーのMEM培地（日水製薬社製）にチャコールデキストラン処理済みFBSを終濃度10%となるよう加えた培地を用いて、ルシフェラーゼ発光測定用兼培養用96穴プレート（コーニングコースター社製#3903）に約 $2 \times 10^4$ 細胞/穴ずつ播種し、一晚培養する。次いで、該細胞に、DMSOに溶解させた被験化学物質を添加する。このとき、被験化学物質の終濃度が試験区ごとに段階的に変り、また、全ての試験区において培養液中の最終DMSO量が0.1%に揃うように溶解液を調製して添加する。被験化学物質が添加されていない系として、溶媒（DMSO）のみが添加された対照区を設け、陽性対照化学物質が添加された陽性対照区も設ける。

被験化学物質が添加された細胞を培養し、被験化学物質添加から36時間後に培地を除き、PBS(-)で2回細胞を洗浄した後、5倍に希釈したPGC50(東洋インキ社製)を20 $\mu$ lずつ加えて室温に30分間放置する。このプレートを、酵素基質自動インジェクター付きルミノメーターLB96P(ベルトールド製)にセットし、50 $\mu$ lの基質液PGL100(東洋インキ製)を自動分注して、ルシフェラーゼ活性を測定する。

実施例3で作製された本発明細胞を用いて、ゲニステインのエストロゲンレセプター $\alpha$ に対するアゴニスト活性を測定した。結果を図1に示す。終濃度1 $\mu$ Mのゲニステインの添加によりルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。

このようにして、目的とするリガンド応答性転写調節因子に対する被験化学物質のアゴニスト活性を測定することができる。

また、被験化学物質とともに、目的とするリガンド応答性転写調節因子のリガンドをEC<sub>50</sub>値程度の濃度となるよう各試験区に添加して、上記と同様に試験を行うと、目的とするリガンド応答性転写調節因子に対する被験化学物質のアンタゴニスト活性を測定することができる。

さらに、実施例6に記載のようにして作製された対照細胞を用いて、同様に測定を行い、その結果に基づいて上記のようにして得られる試験結果を補正してもよい。

#### 【発明の効果】

本発明により、リガンド応答性転写調節因子の転写調節を受ける遺伝子の転写活性を測定するための動物細胞、該細胞を用いて前記因子の転写調節能に対する化学物質の作用を評価する方法等が提供可能となる。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

エストロゲンレセプター $\alpha$ の転写調節を受ける遺伝子の転写活性を測定するための本発明細胞を用いたレポーターアッセイによって、ゲニステインのエストロゲンレセプター $\alpha$ 活性化能を測定した結果を示す図である。カラムは左から、被験物質の溶媒に用いたDMSOのみを添加した区(DMSO)、終濃度10nMとなるよう17 $\beta$ エストラジオールを添加した区(10nM E2)、終濃度100pMとなるようゲニステインを

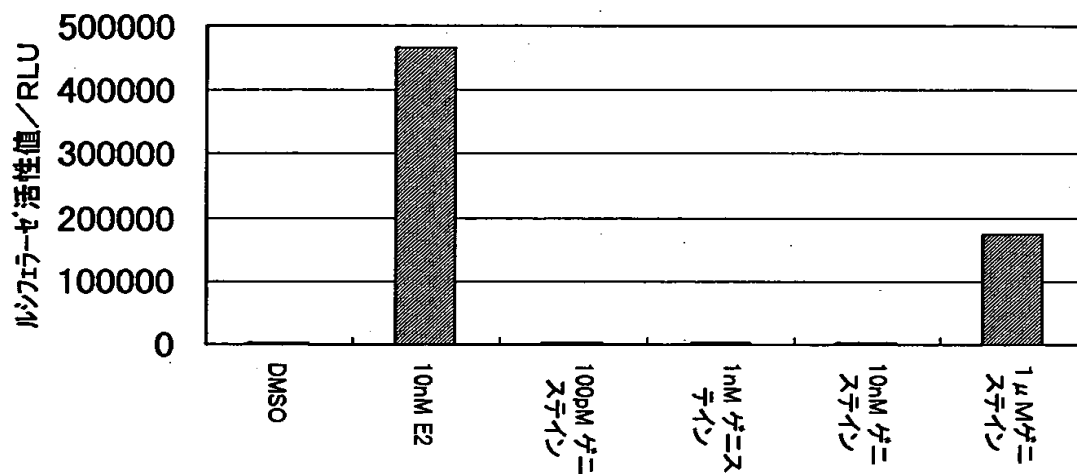
添加した区 (100pMゲニステイン)、終濃度1nMとなるようゲニステインを添加した区 (1nMゲニステイン)、終濃度10nMとなるようゲニステインを添加した区 (10nMゲニステイン)、終濃度1 $\mu$ Mとなるようゲニステインを添加した区 (1 $\mu$ Mゲニステイン) を示す。



【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

リガンド応答性転写調節因子の転写調節能に対する化学物質の作用を調べるための効率的な方法を提供すること。

【解決手段】

レポーター遺伝子の発現量を指標にして、リガンド応答性転写調節因子の転写調節を受ける遺伝子の転写活性を測定するための動物細胞を作製する過程において、動物細胞を、(a) リガンド応答性転写調節因子認識配列と動物細胞で機能可能な最小プロモーターとから実質的に構成される転写調節領域の下流に機能的に接続されてなるレポーター遺伝子と (b) 動物細胞で機能可能な細胞選択マーカー遺伝子とを同一分子上に含むDNAにより、安定に形質転換する工程を含むことを特徴とする転写活性測定用細胞の作製方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002093]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号  
氏 名 住友化学工業株式会社